

M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2



ELVÁLASZTÁSTECHNIKA (BMEVEMBM203)

AZ ELVÁLASZTÁSTECHNIKA KORSZERŰ MÓDSZEREI (BMEVESAM203)

TÖRÖK KITTI

KTOROK@MAIL.BME.HU

Bioanalitikai módszerek

Bioanalitika - definíció



Tágabb értelemben:

Az analitika egy alterülete, mely a biomolekulák vizsgálatával foglalkozik

- Azonosítás
 - azonosság, szekvencia
- Karakterizálás
 - tulajdonságok, szerkezet, kölcsönhatások...
- Mennyiségi meghatározás
- Monitorozás
 - stabilitás, dinamika, degradáció, metabolizmus...



Szűkebb értelemben:

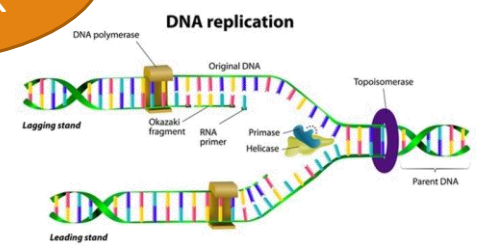
Biokémiai reakción alapuló módszerek

Bioanalitika - csoportosítás

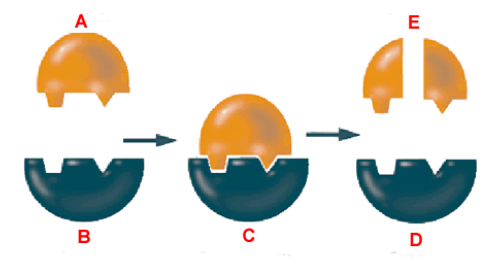


Bio kémiai reakción alapuló módszerek

DNS alapú módszerek



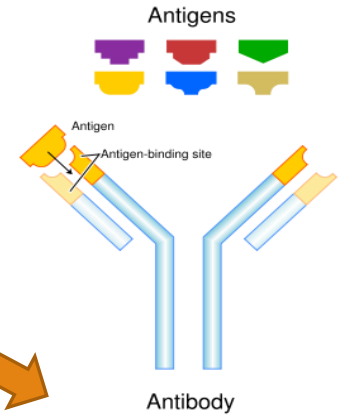
- PCR
- RT-PCR
- PCR-ELISA
- DNS chipek
- ...



Enzimes módszerek

- Szubsztrát meghatározás
- Enzimaktivitás mérés
- Immobilizált enzimes technikák
- ...

fehérje alapú módszerek



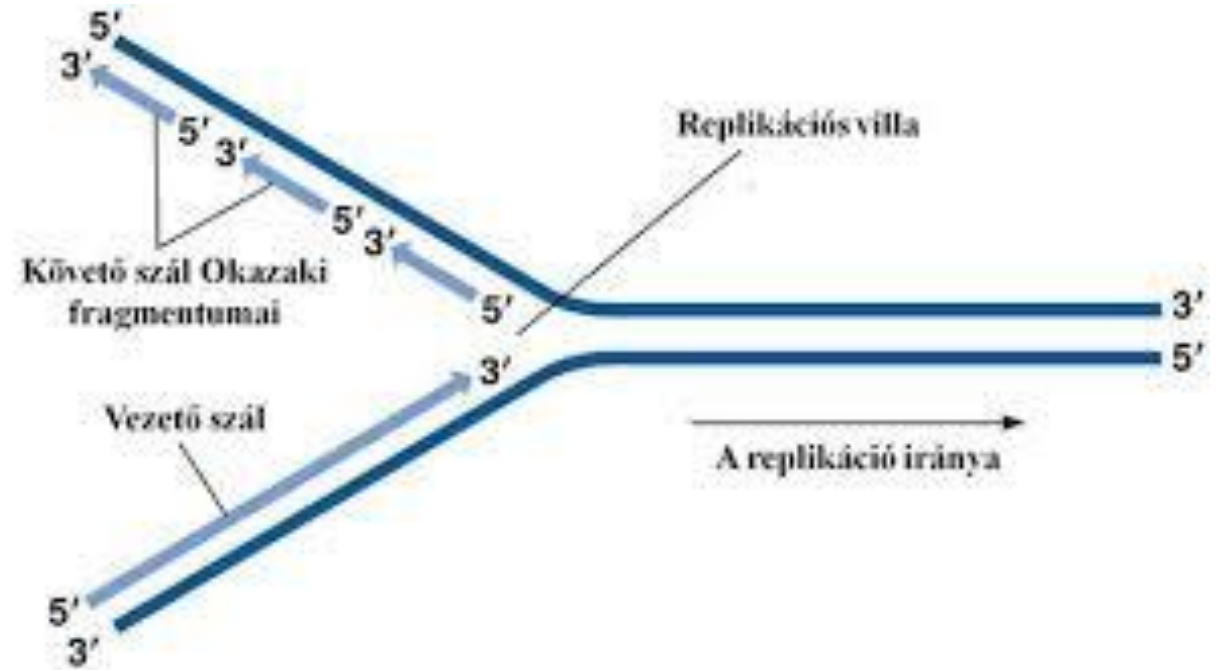
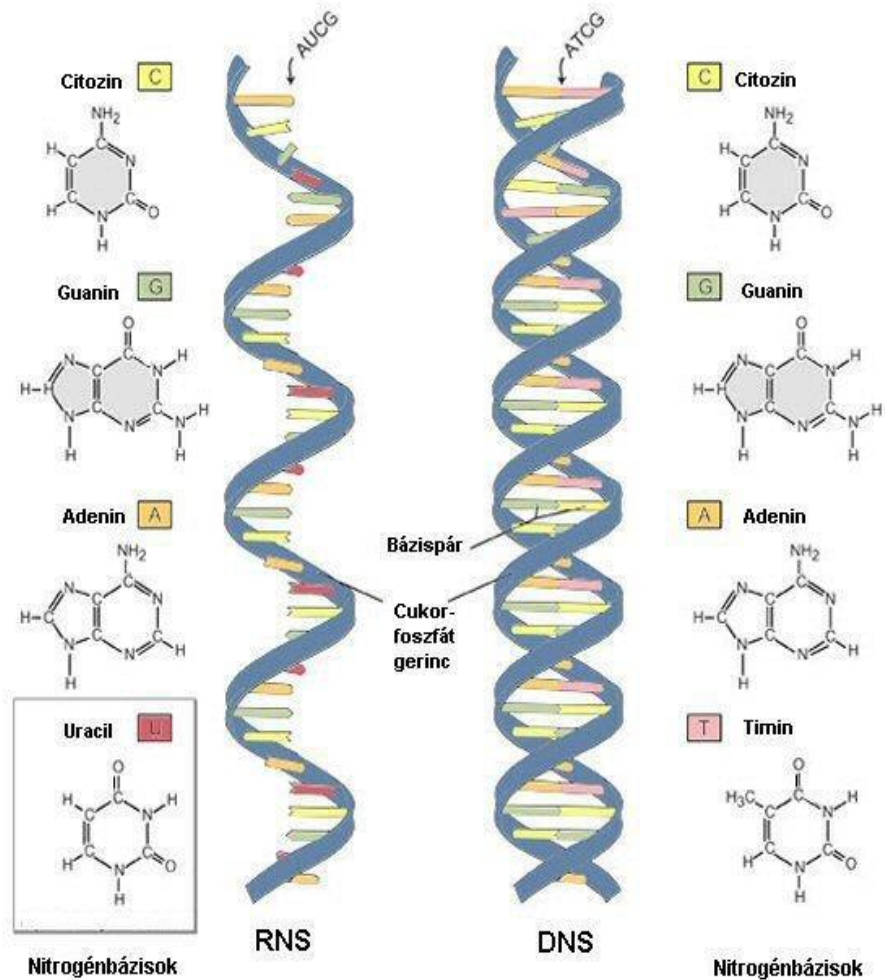
Immunanalitikai módszerek

- ELISA
- LFD
- Immunoblot
- Immundiffúzió
- ...

Bioanalitika – DNS alapú technikák



Bioanalitika – DNS, RNS alapú technikák



PCR – elv



Polymerase Chain Reaction – polimeráz lánc reakció

DNS extrakciója és tisztítása

Sejtlízis



Endonukleázok inaktiválása (EDTA)



Extrakció



Tisztítás

DNS extrakciója és tisztítása



Egy specifikus DNS szekvencia felsokszorosítása

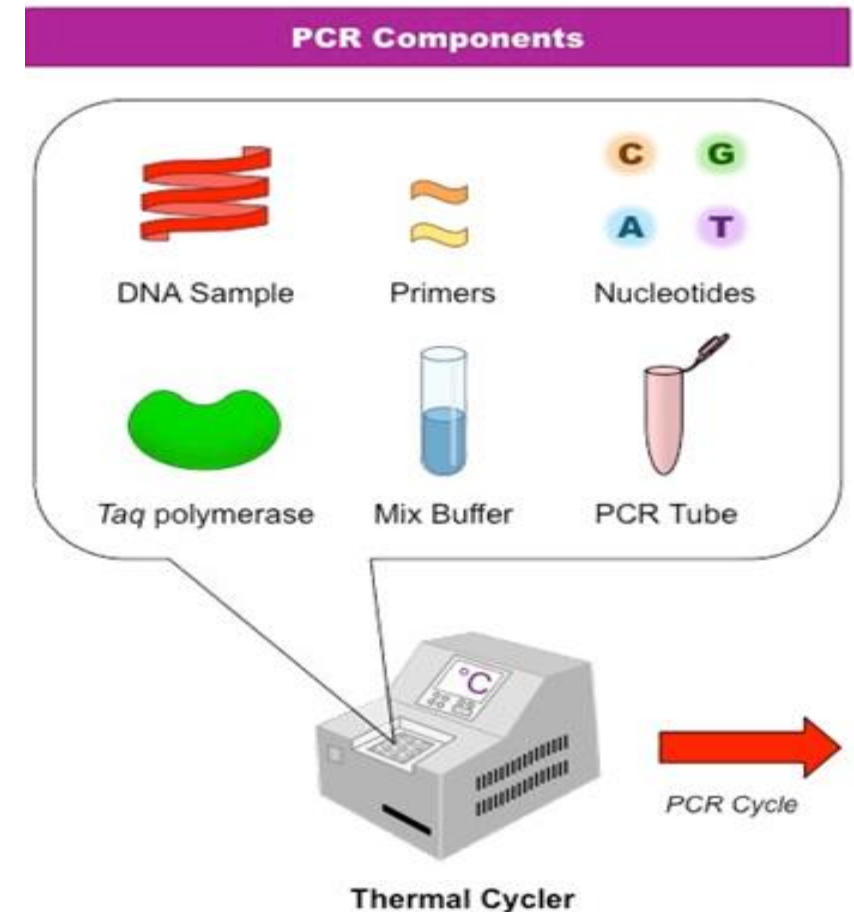


A felsokszorosított DNS termék (amplicon) detektálása

PCR – reakcióelegy



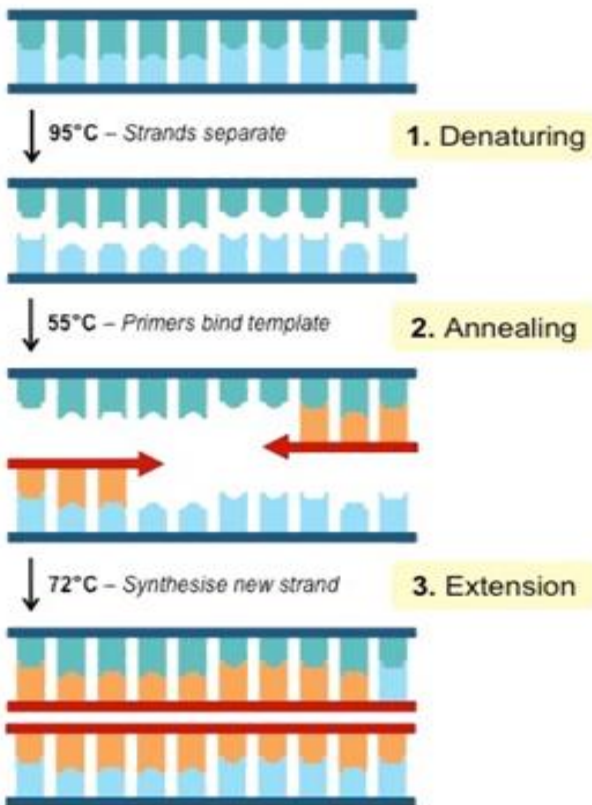
- **Templát DNS**
A mintából izolált DNS szakasz
- **Nukleotidok**
A DNS-t felépítő négyféle nukleotid: adenozin, timin, citozin, guanin
- **Primerek**
15-30 nukleotid hosszúságú primer, a tapadási helye jelöli ki a felsokszorosítandó DNS szakasz kezdetét
- **DNS-polimeráz enzim**
Taq polimeráz, termostabil enzim, ami a felsokszorosítást végzi
- **Egyéb komponensek**
PCR puffer, enzim stabilizátor MgCl₂



PCR – a szintézis lépései



PCR Process (ONE Cycle)



Denaturáció

94-97 °C → DNS két szálát összetartó hidrogén hidak felszakadnak
30-60 s

Primerek megtapadása (annealing)

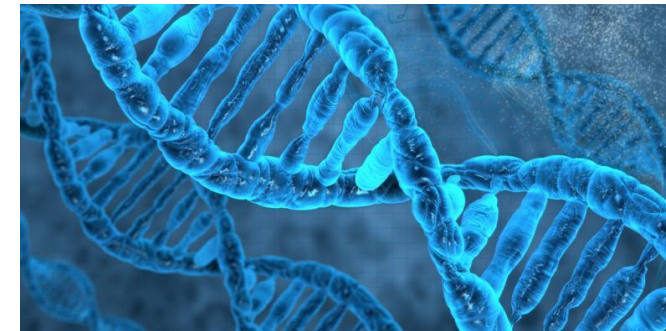
45-65 °C → primerek bekötődnek az egyszálú templátok komplementer szekvenciáihoz
30-60 s

Polimerizáció (extension)

72 °C → DNS-polimeráz enzim Mg²⁺ ionok jelenlétében megszintetizálja a DNS kiegészíti szálát
30-90 s

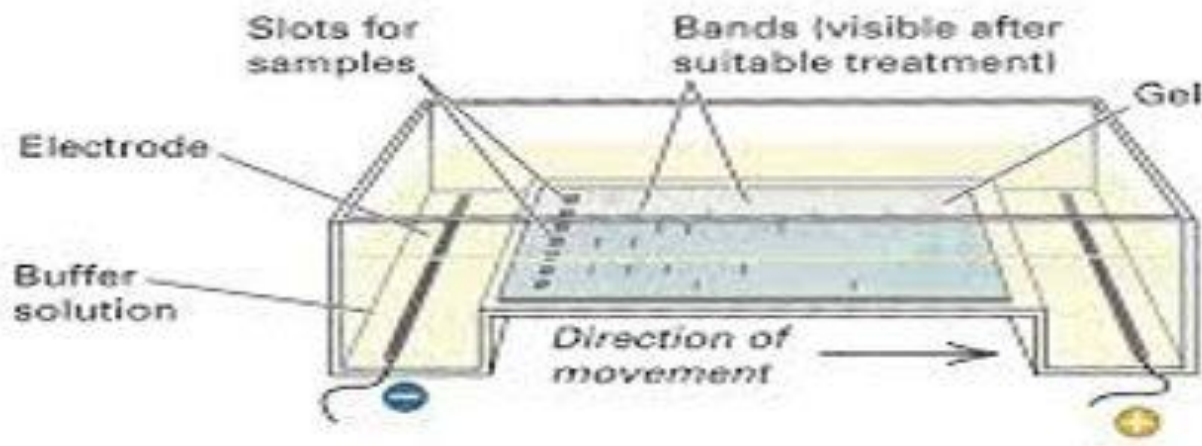
25 – 45 ciklus (n) → 2ⁿ számú kópia

PCR – detektálás

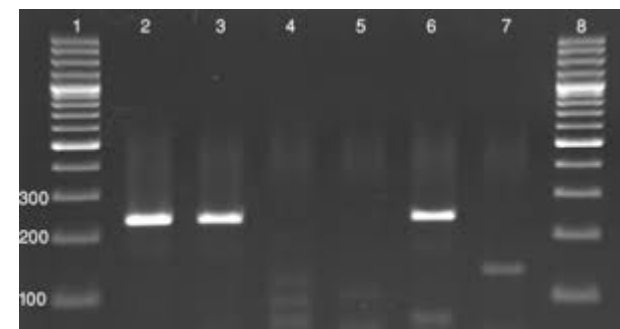


Agaróz gélelektroforézis

Agarose gel electrophoresis of DNA



- Agar agar gél
- Felbontás néhány 10 bp
- Detektálás DNS kötő fluoreszcens festék (pl. etídium-bromid)
- Minőségi meghatározás



PCR - detektálás

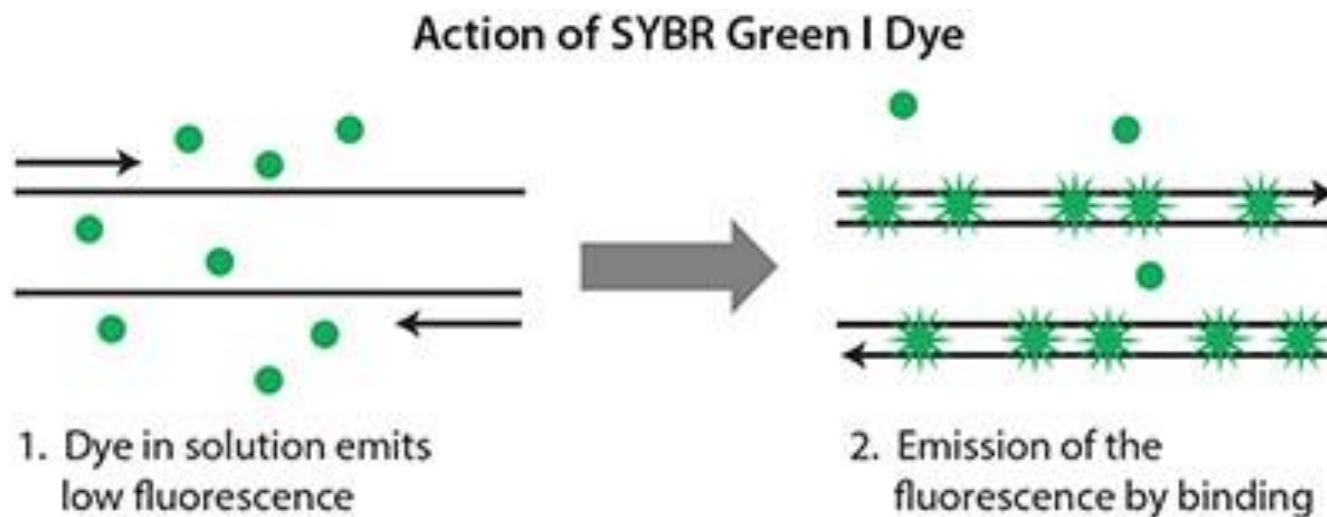


Mennyiségi meghatározás  **Real-time PCR (RT-PCR)**

- Interkalálódó festék
- Taqman módszer
- FRET módszer

SYBR Green I

- Interkalálódó festék
- Kettős szálú DNS-hez kötődik
- 530 nm-en detektálható



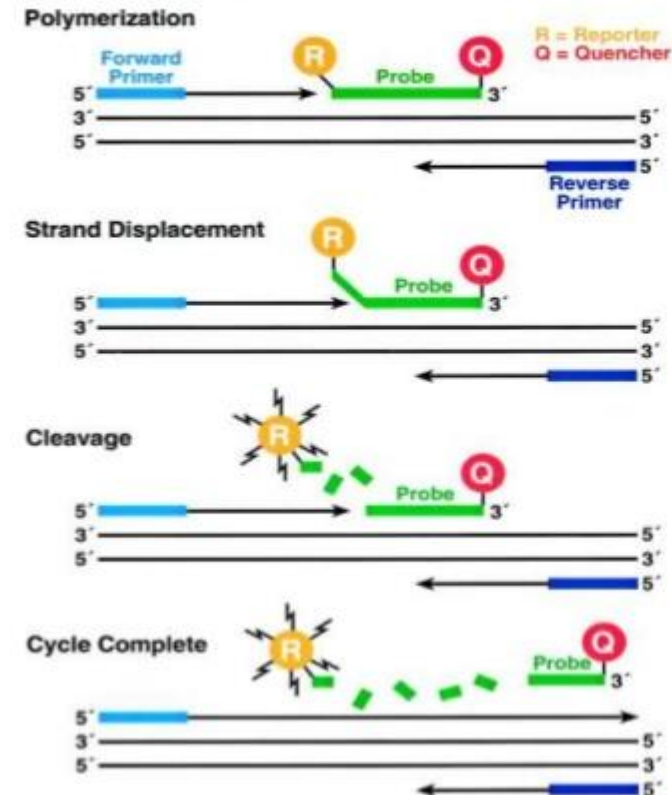
PCR - detektálás



Taqman módszer

- Q (quencher-kioltó) és R (reporter-jelző) festékek
- Denaturálódó DNS szálra próbaszekvencia hibridizálása
- Q gerjesztési frekvenciája jóval kisebb
- Förster féle rezonancia energia transzformáció (FRET)
- Förster-féle távolság (~100 nm)
- A távolságon belül R átadja az energiáját Q-nak, csak Q gerjesztődik

TaqMan probe :-



PCR – előnyök/hátrányok

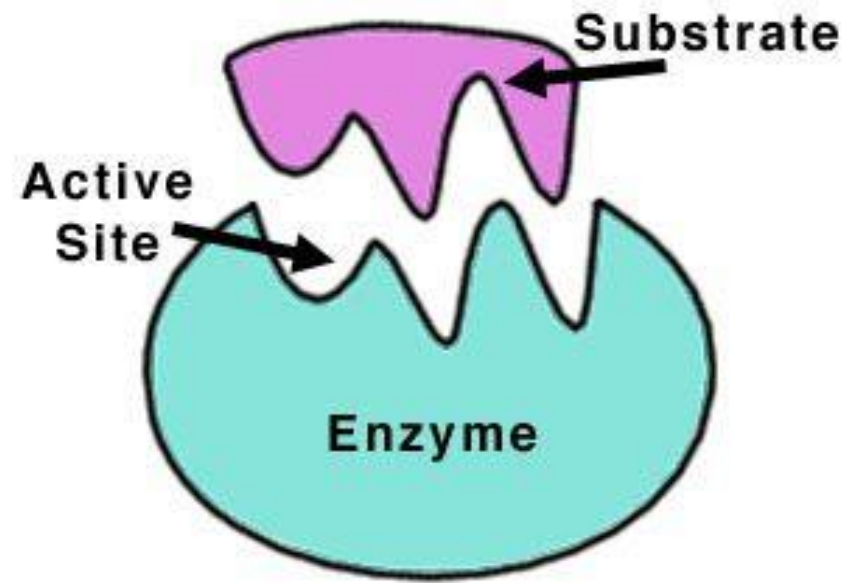


- Specifikus
- Gyors
- Mennyiségi meghatározásra is alkalmas
- DNS stabilitás (feldolgozott minták esetén fontos)

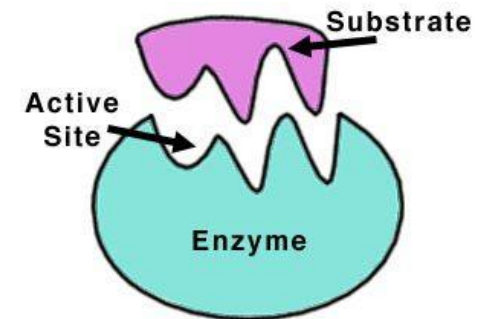
- Drága
- Keresztreakciók lehetősége
- Fals pozitív és negatív eredmények (pl. élő vagy élettelen mikroba)
- Szakképzettséget igényel



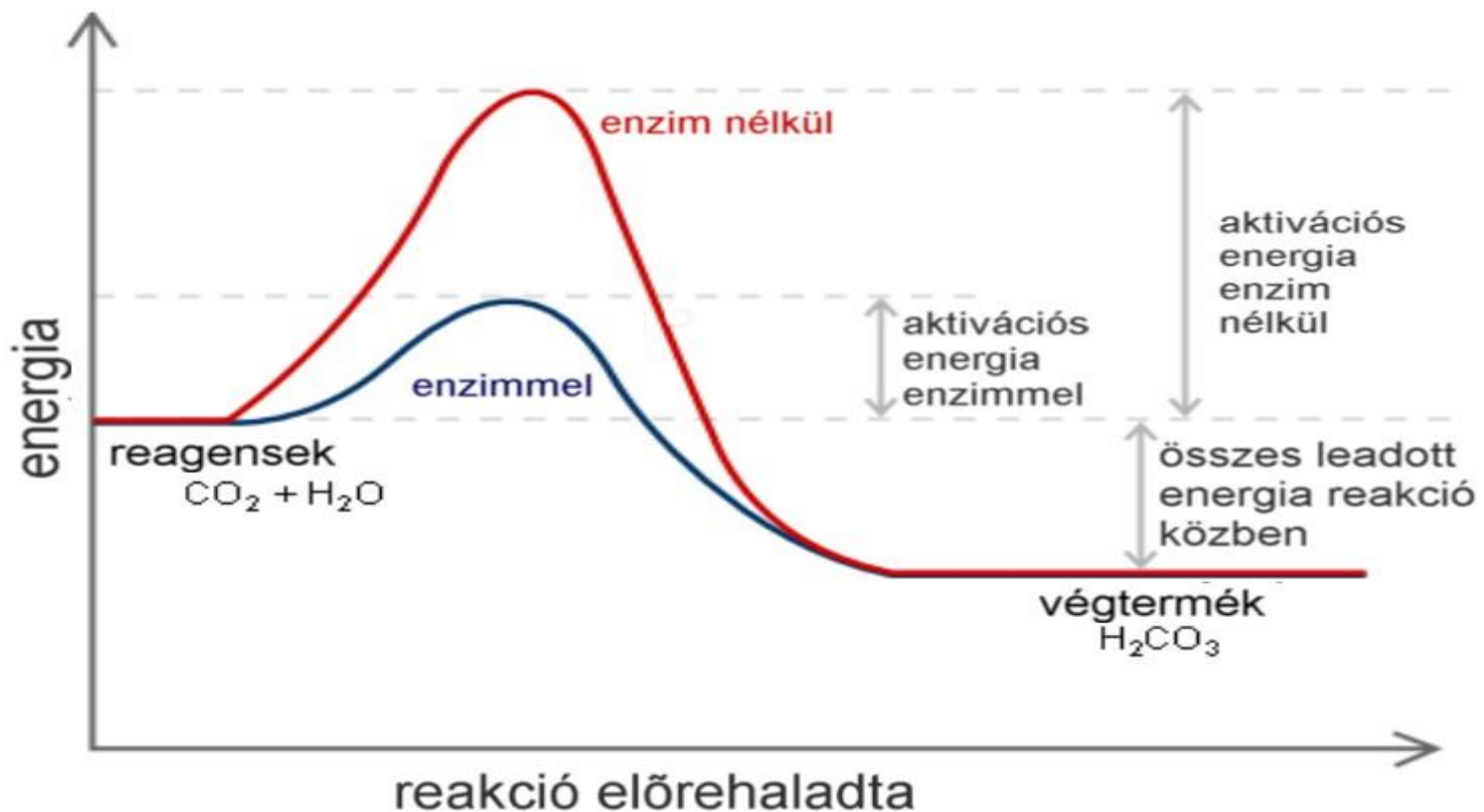
Bioanalitika – enzimés módszerek



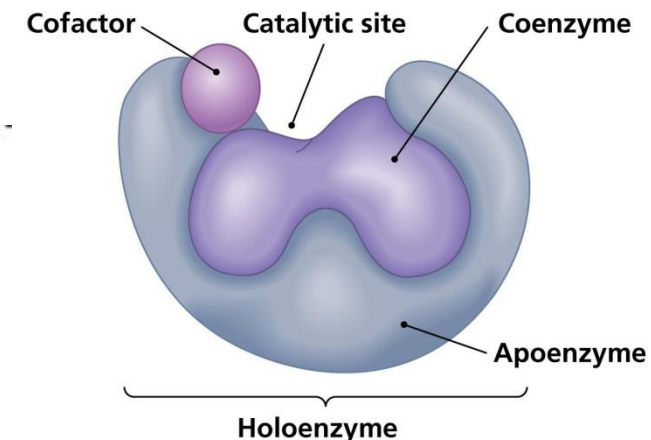
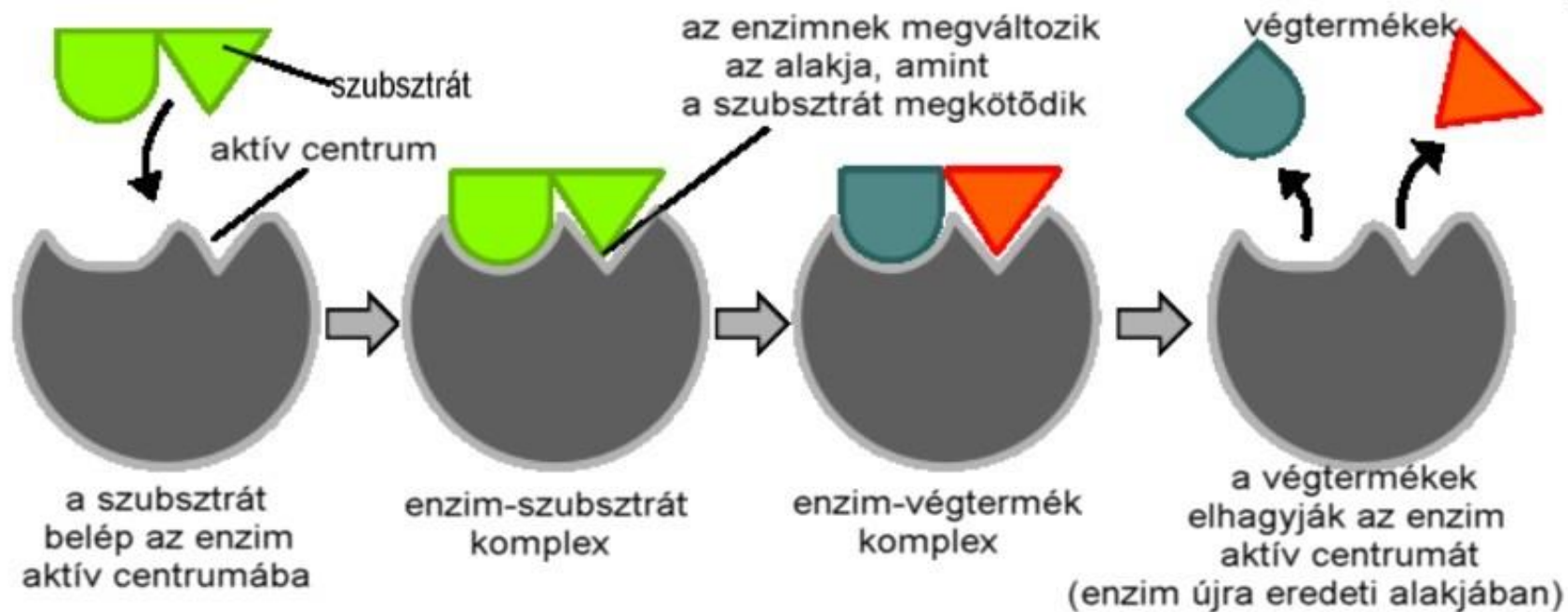
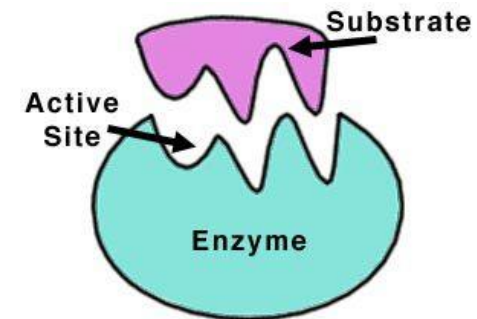
Enzimek



Enzimek - biokatalizátorok

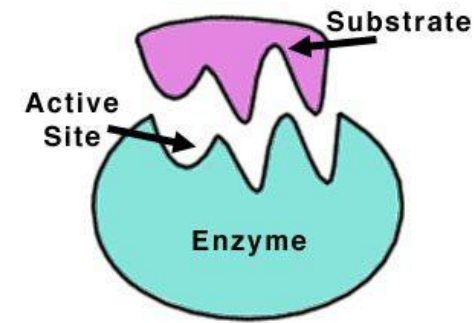


Enzimek



- Kulcs-zár elmélet
- Fluktuációs elmélet
- Indukált illeszkedés elve

Enzimes módszerek - csoportosítás



Szubsztrát meghatározás

- Végpont módszer
- Kinetikai módszer

Enzimaktivitás mérés

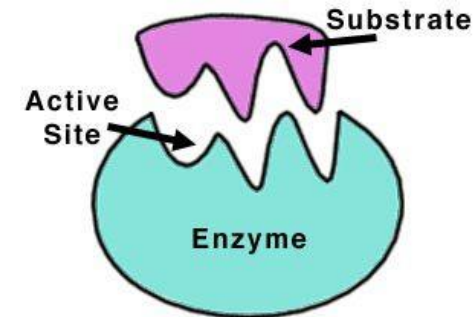
- Kétpontos módszer
- Kinetikai módszer

Immobilizált enzimes technikák

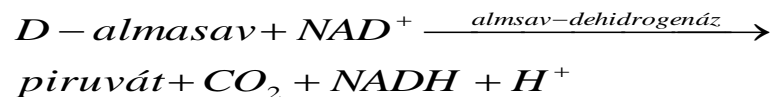
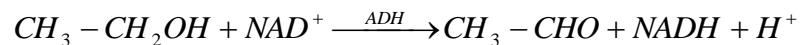
- Enzimelektrodok
- Enzimreaktorok
- Tesztcsíkok
- Bioszenzorok

Enzim mint marker

Szubsztrát meghatározás



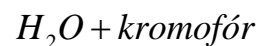
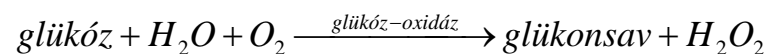
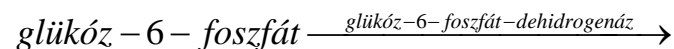
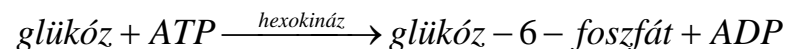
Végpont módszer (klasszikus)



Kinetikai módszer

Reakciósebesség meghatározása

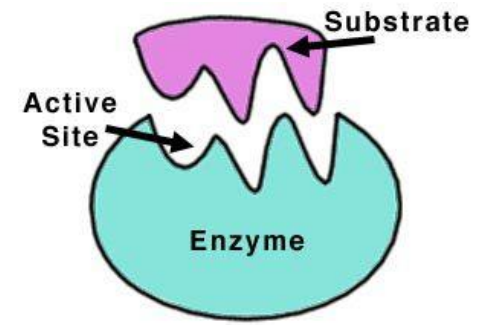
Végpont módszer (kapcsolt)



Detektálás

- fotometriás
- fluorimetriás
- elektrokémiai
- izotópos
- manometriás
- kromatográfiás, MS

Enzimaktivitás mérés



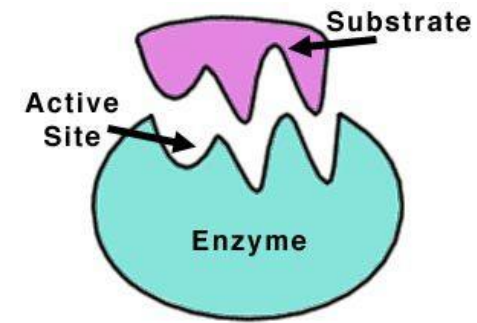
Kétpontos módszer (átlagos reakciósebesség)

Az átalakult szubsztrát vagy a keletkezett termék mennyiségét határozzuk meg a reakció elejét képező rövid időintervallumban

Kinetikai módszer (pillantanyi reakciósebesség)

A reakció kialakulásának követése az idő függvényében

Immobilizált enzimes technikák

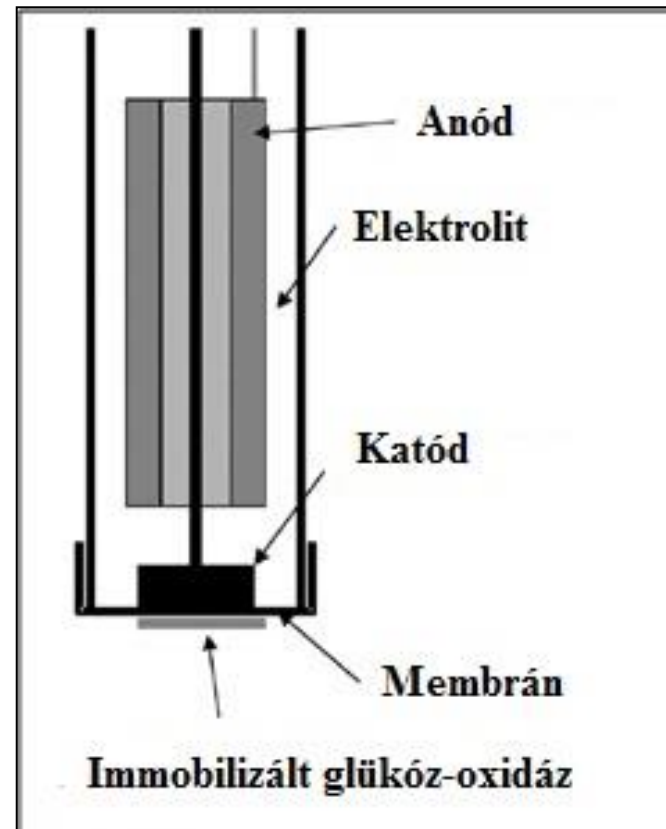


Rögzített enzimek felhasználása

- Enzimreaktor
- Enzimes elektród
- Bioszenzor
- Gyorsvizsgálati tesztcsíkok

Immobilizálási technikák

- Kovalens kötőerők
- Intermolekuláris keresztkötések
- Adszorpció
- Mikrokapcsolás

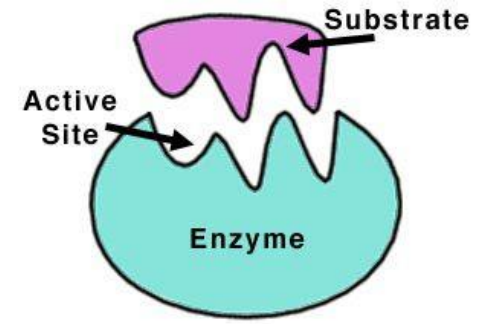


GLÜKÓZELEKTRÓD

Immobilizált enzimek előnyei

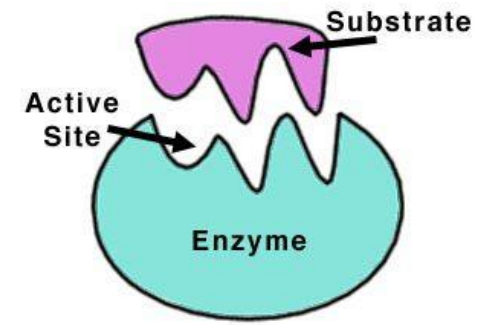
- Újrafelhasználási lehetőség
- Nagyszámú analízis
- Nagyobb stabilitás

Enzim, mint marker



Immunanalitikai módszerek

Enzimes technikák – előnyök/hátrányok

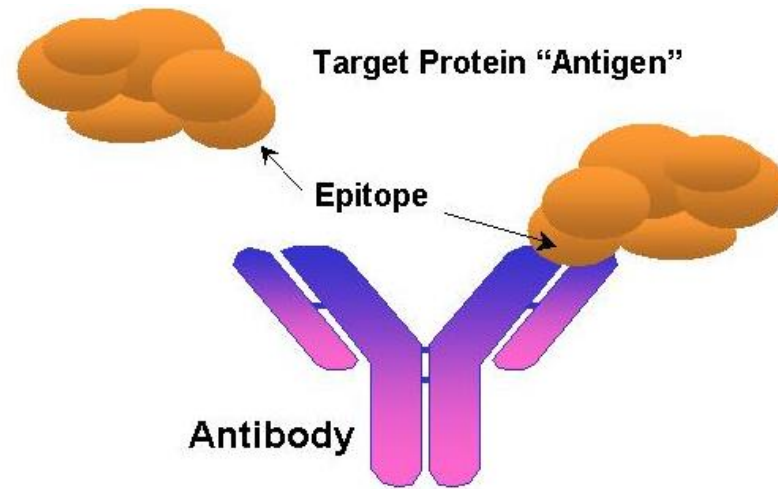


- Specifikus
- Érzékeny
- Gyors
- Nem igényel bonyolult műszereket
- Automatizálható, gyorstesztokra alkalmas

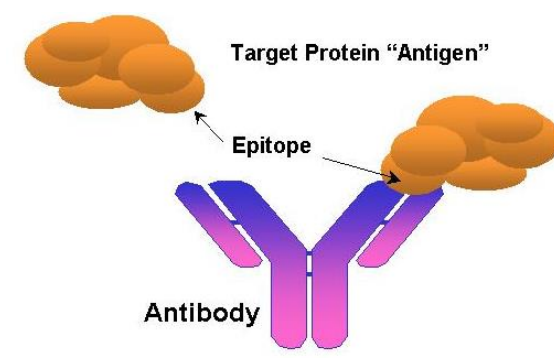
- Nagy tisztaságigény
- Zavaró komponensek
- Drága a tisztítás és a rögzítés
- Lassú lehet (végpont módszer)



Bioanalitika – immunanalitikai módszerek



Immunanalitikai módszerek - definíció



Antigén – antitest (ellenanyag) reakción alapuló módszerek

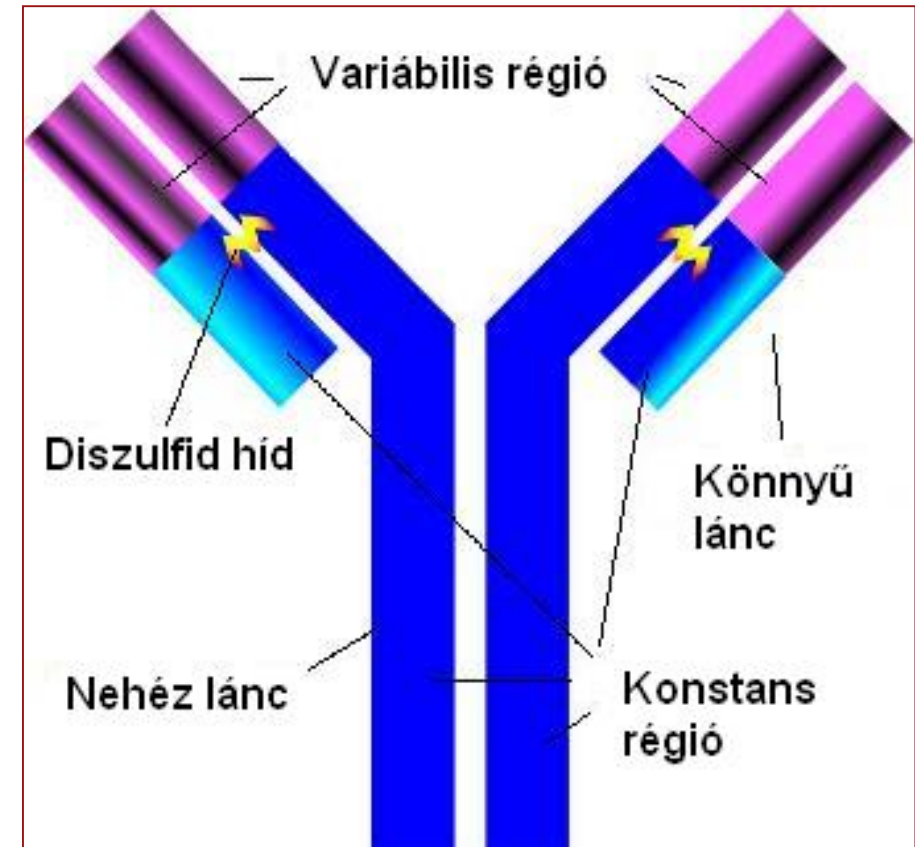
Ellenanyagok funkciója:

- Idegen eredetű anyagok felismerése és elpusztítása
 - Komplement aktiváció
 - Transzportfunkció
 - ...
-
- Monoklonális ellenanyag
 - Poliklonális ellenanyag

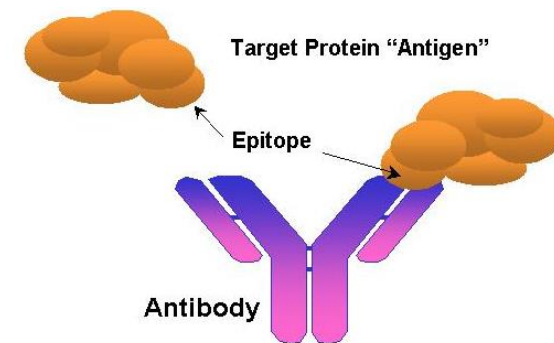
Antigén

Idegen vagy idegenként felismert anyag

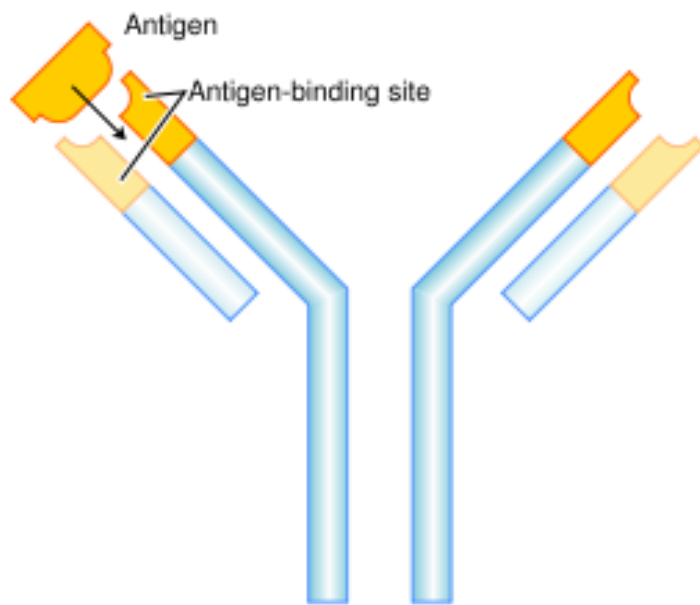
Epitóp – antigén az a részlete, amit az antitest felismer



Immunanalitikai módszerek - csoportosítás



Antigens



Antibody

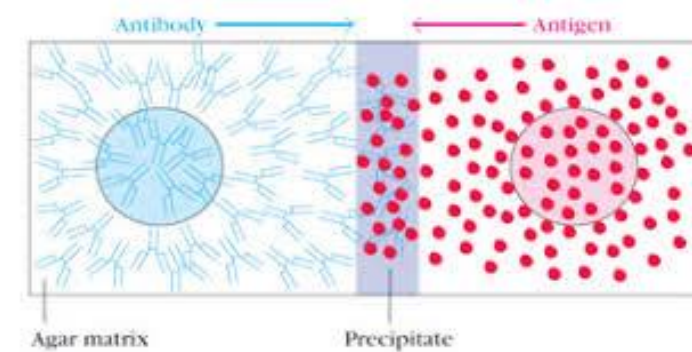
Diffúziós és elektroforetikus technikák

- Immundiffúzió
- Immunelektroforézis
- Immunoblotting

Jelölt ellenanyagot vagy antigént alkalmazó technikák

- Immunfluoreszcencia
- Radioimmunológia
- ELISA
- LFD

Immundiffúzió



Egyszerű immundiffúzió

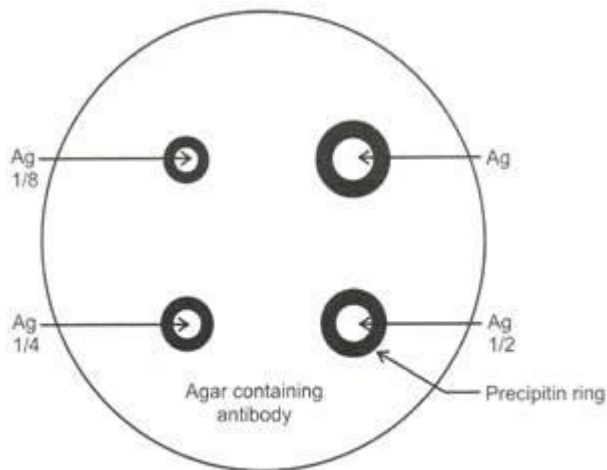
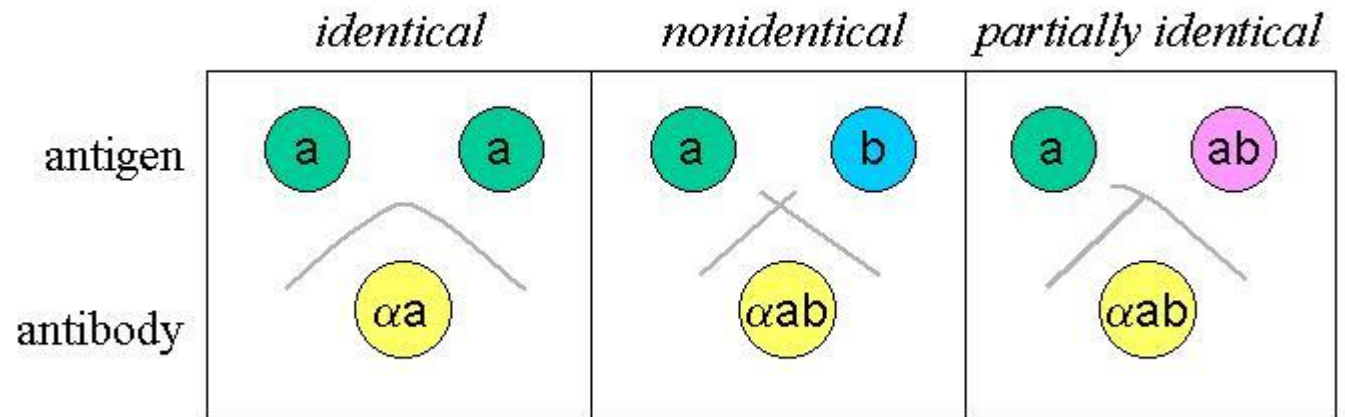


Fig. 27.4: Single radial immunodiffusion

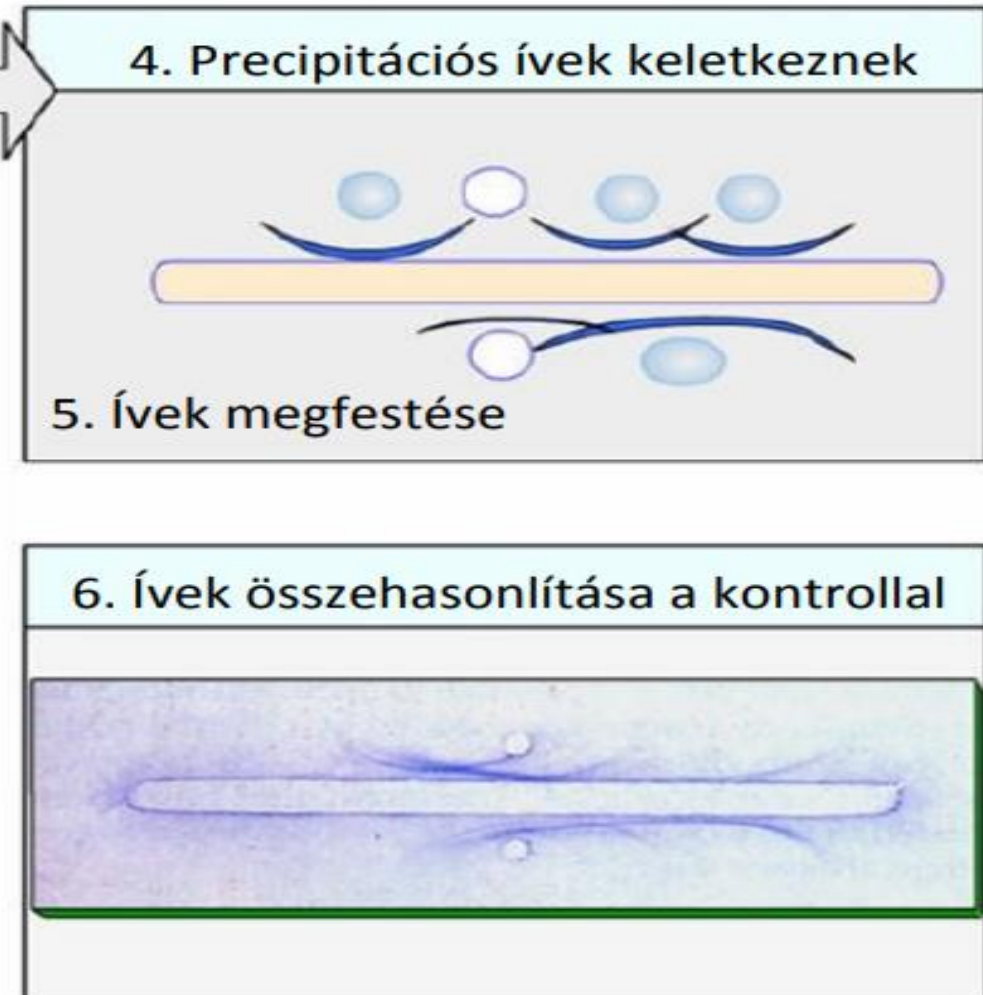
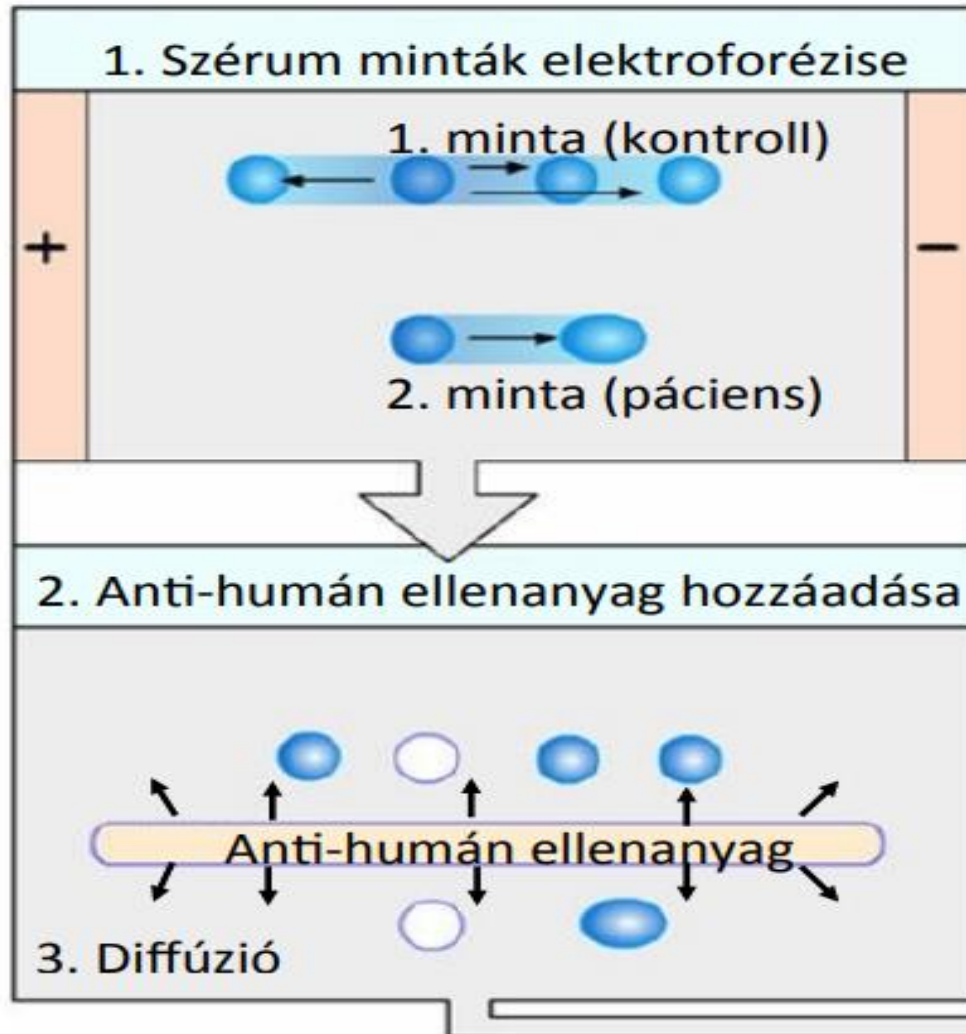
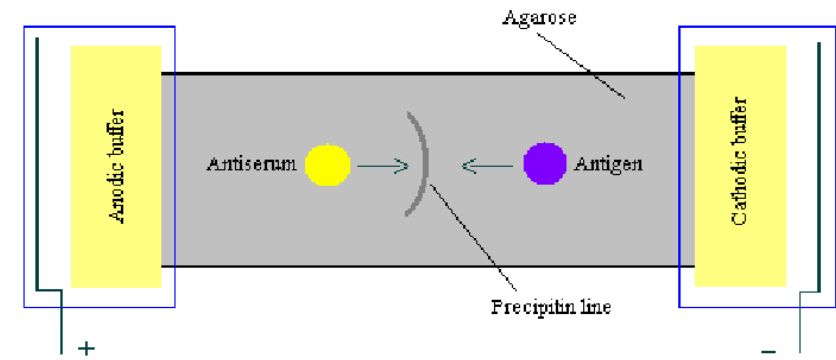
Kioltási zóna nagysága arányos az antigén mennyiségével

Kettős immundiffúzió

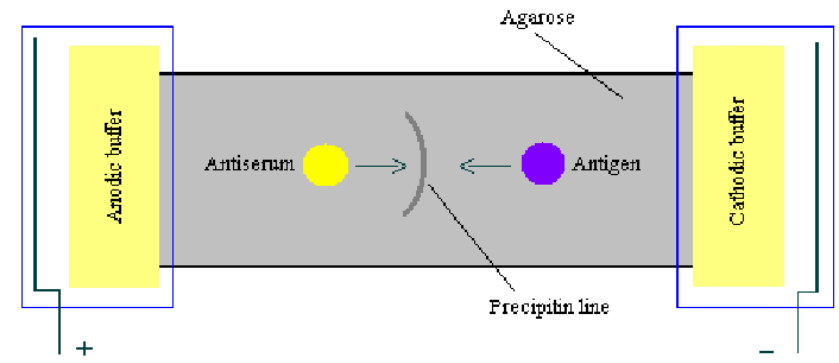


Csak összehasonlító vizsgálatokra alkalmas, precipitációs sáv alakja alapján eldönthető, hogy két minta azonos antigéneket tartalmaz-e

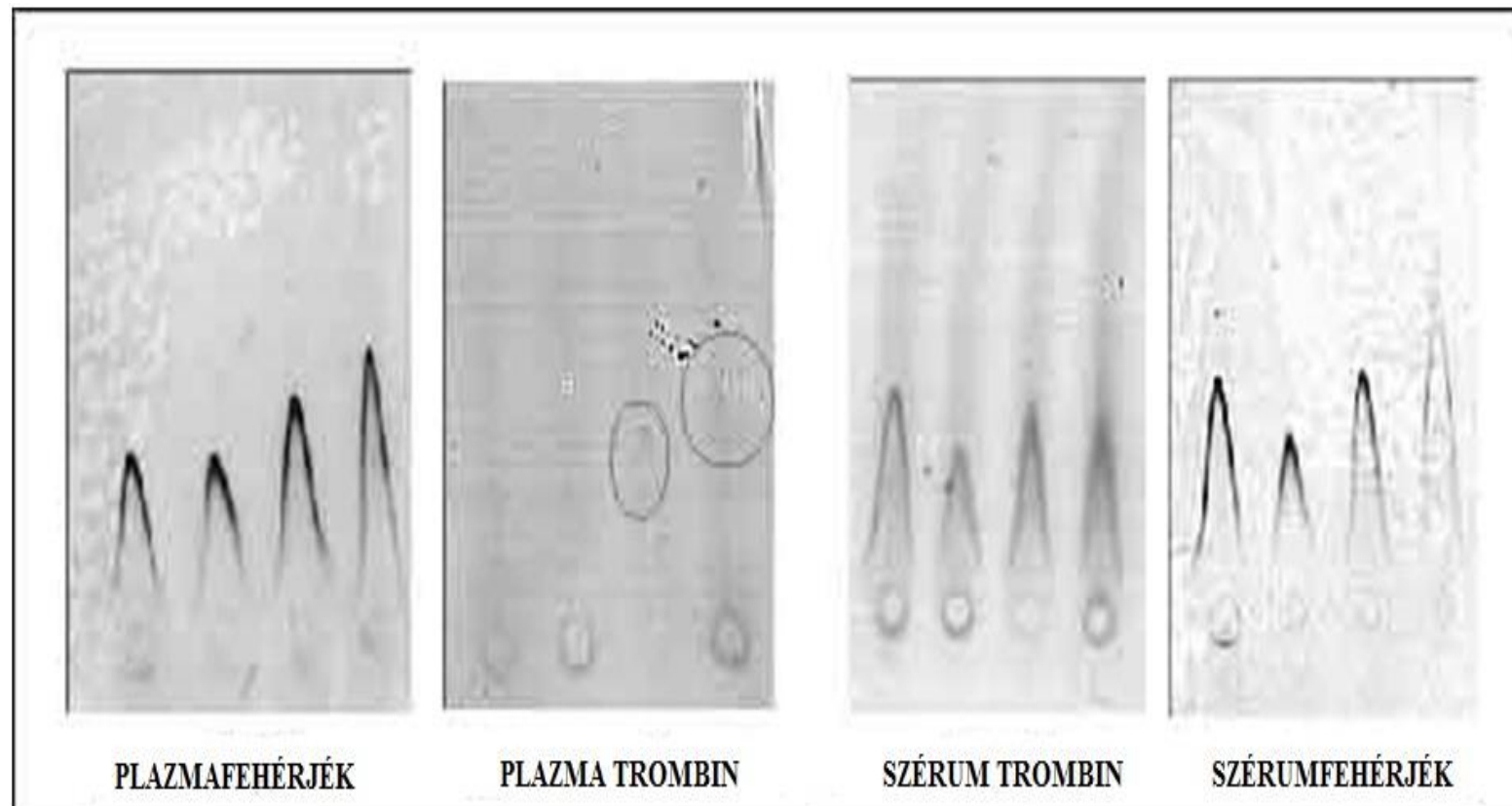
Immunelektroforézis I.



Immunelektroforézis II.



Rakéta immunelektroforézis



Immundiffúzió, immunoelektroforézis – előnyök/hátrányok



- Specifikus
- Nem igényel bonyolult műszereket
- Nem igényel specifikus szaktudást

- Lassú
- Érzékenység
- Mennyiségi meghatározás problémás lehet
- Rutinanalitikára, nagyszámú minta vizsgálatára nem alkalmas



ELISA



Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

CSOPORTOSÍTÁS

Meghatározás típusa alapján

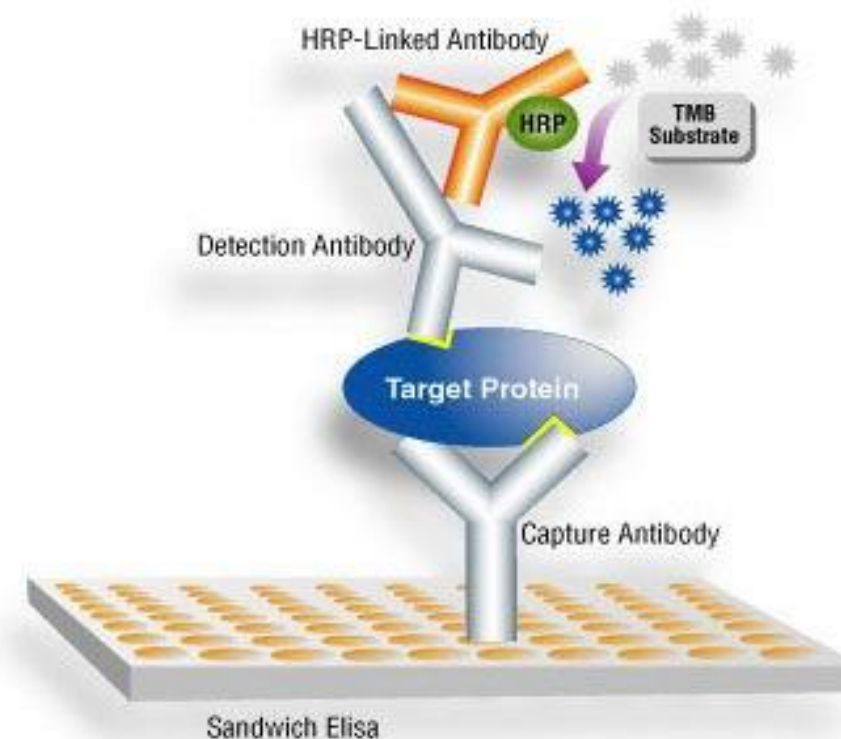
- Direkt
- Indirekt

Versengés alapján

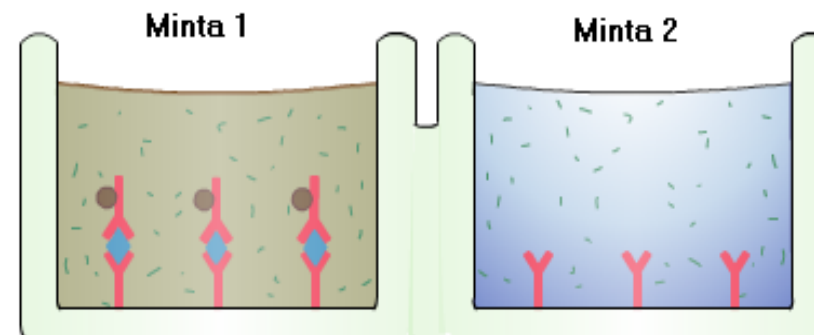
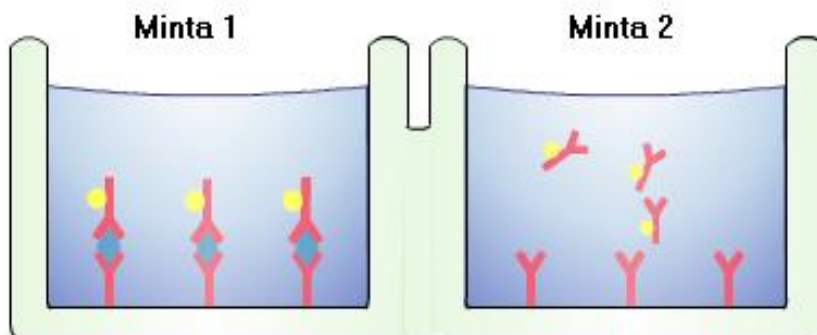
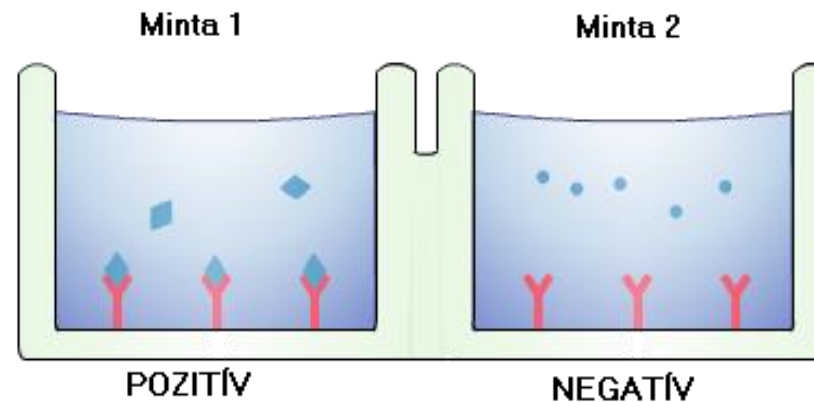
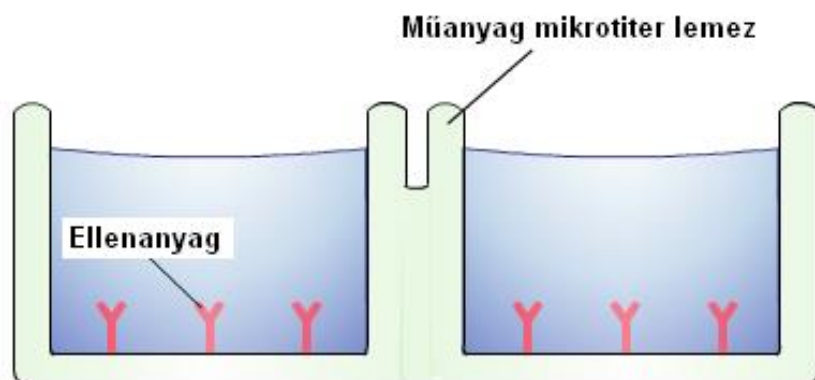
- Kompetitív
- Nem kompetitív

Enzimjelölés alapján

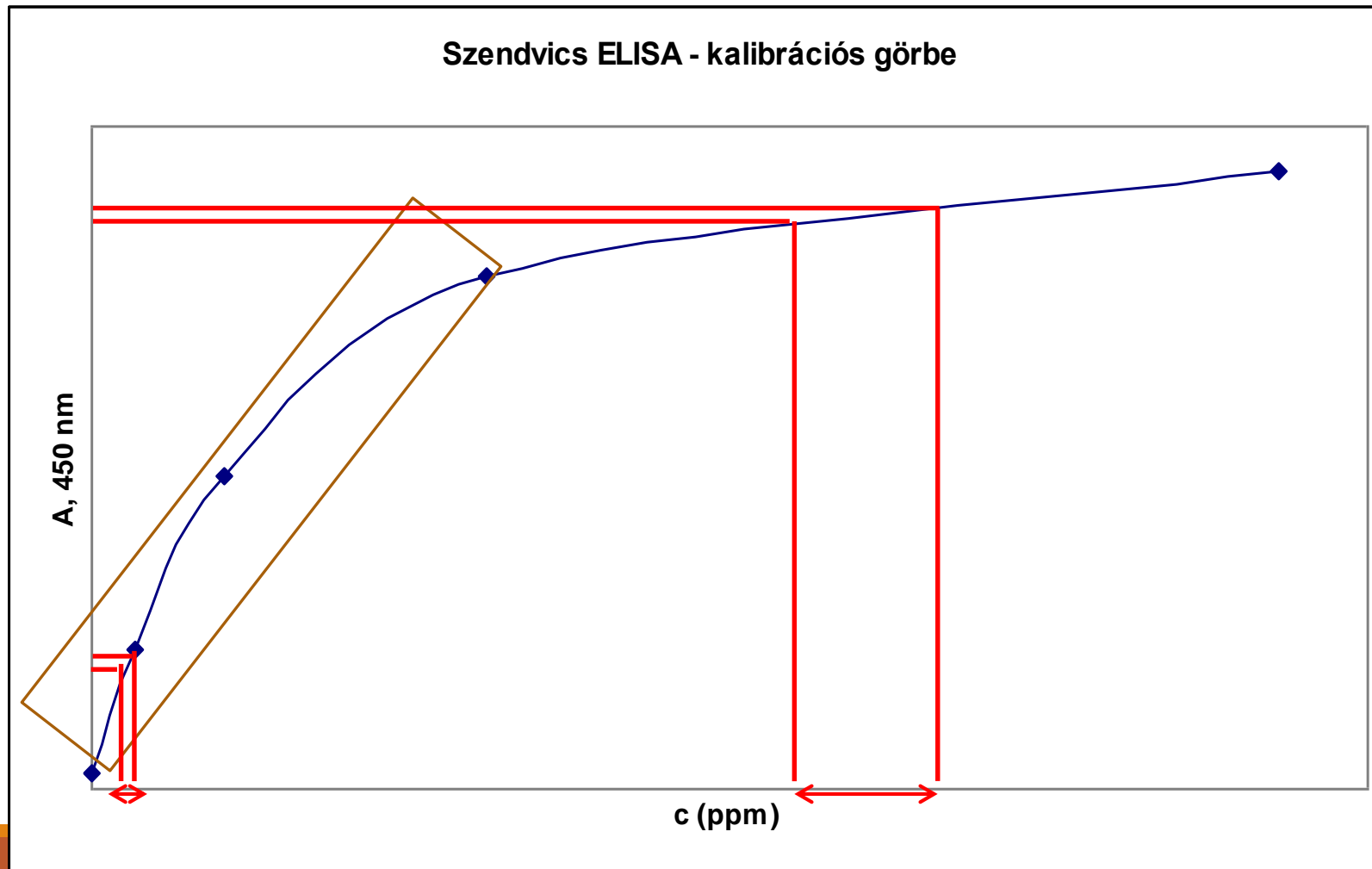
- Jelölt antitest
- Jelölt antigén



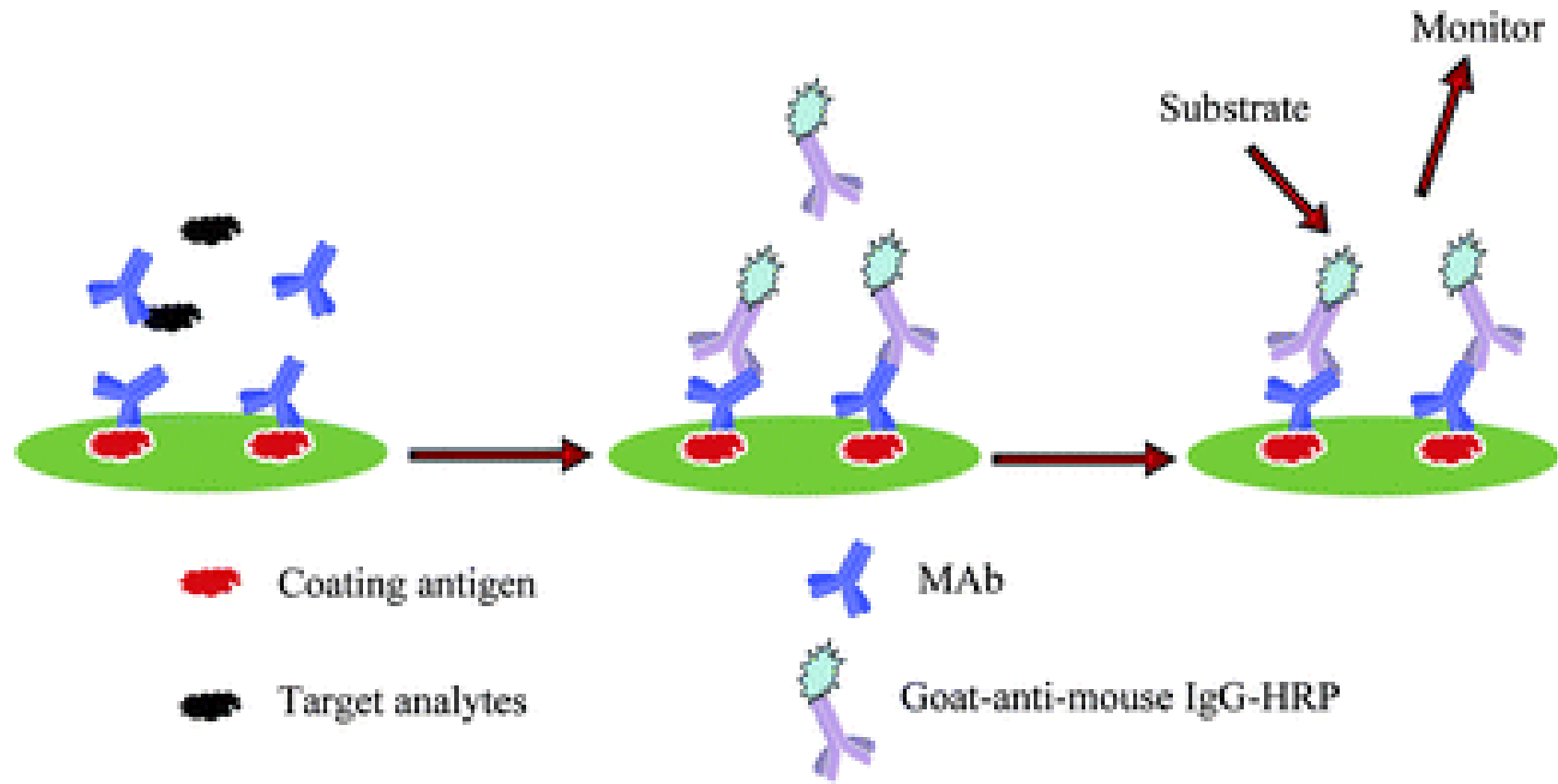
Szendvics ELISA



Szendvics ELISA



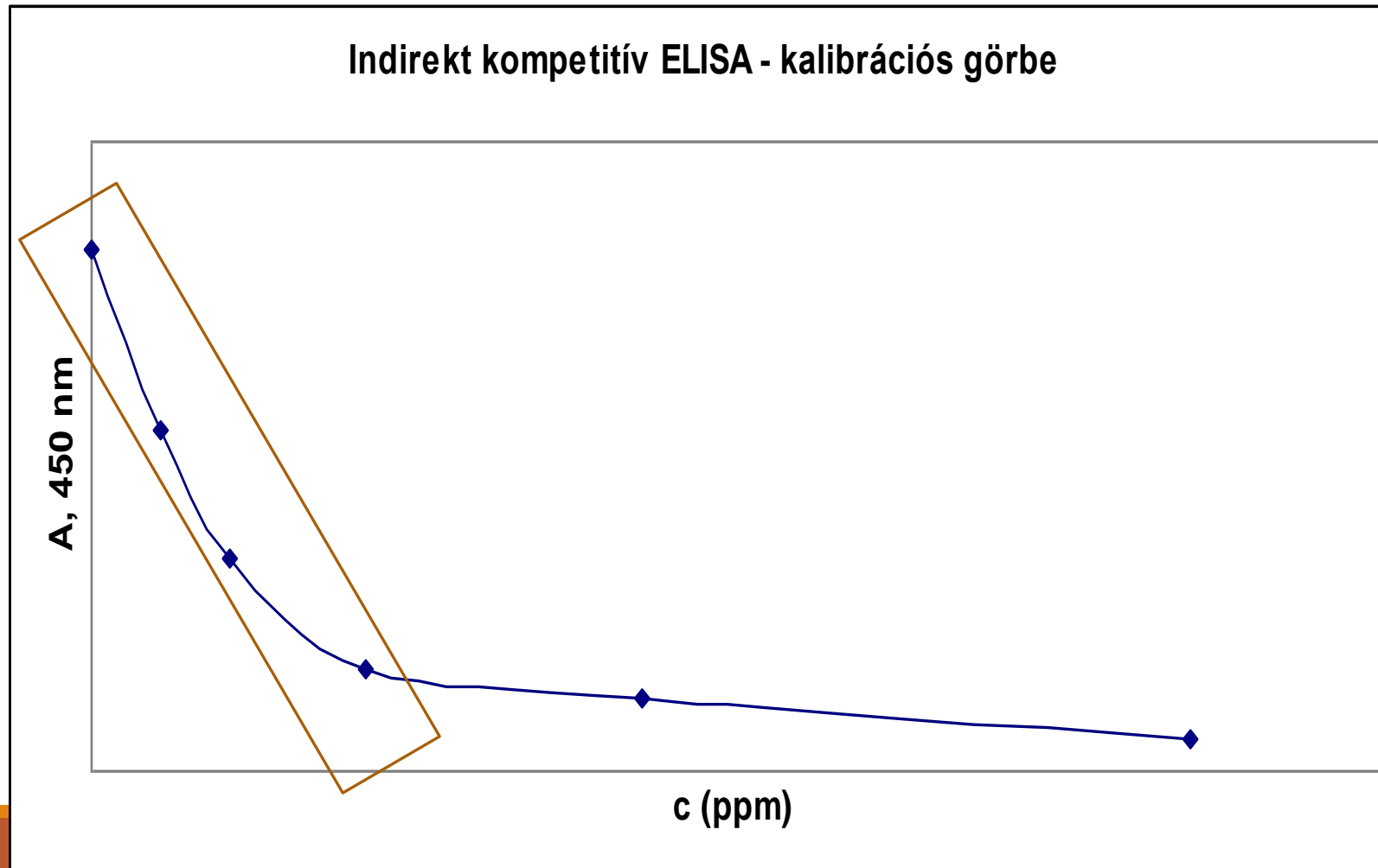
Indirekt kompetitív ELISA



Indirekt kompetitív ELISA



Indirekt kompetitív ELISA - kalibrációs görbe



ELISA – előnyök/hátrányok



- Specifikus
- Érzékeny
- Gyors
- Viszonylag nagy áteresztőképesség
- Nem igényel bonyolult műszereket
- Nem igényel specifikus szaktudást



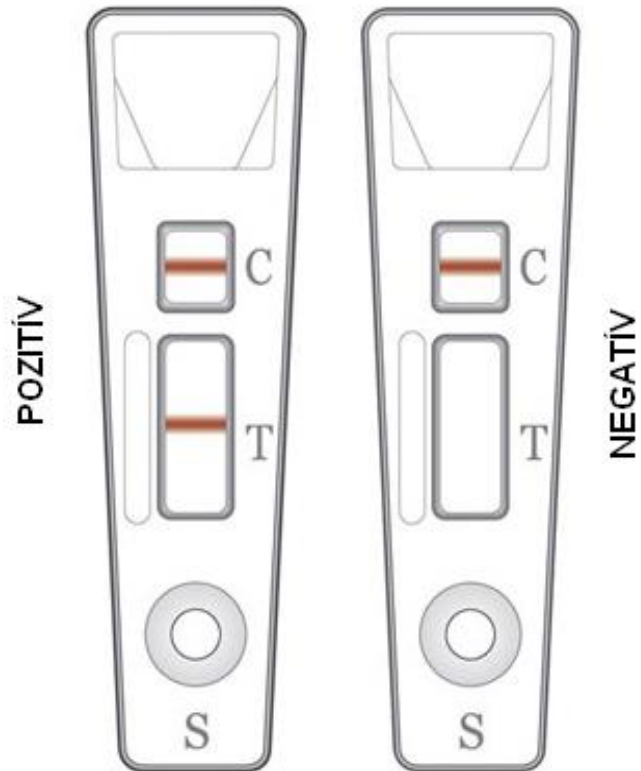
- Drága
- Keresztreakciók lehetősége
- Immunreakcióból adódó hibaforrások
- Mérési bizonytalanság, kalibráció



LFD



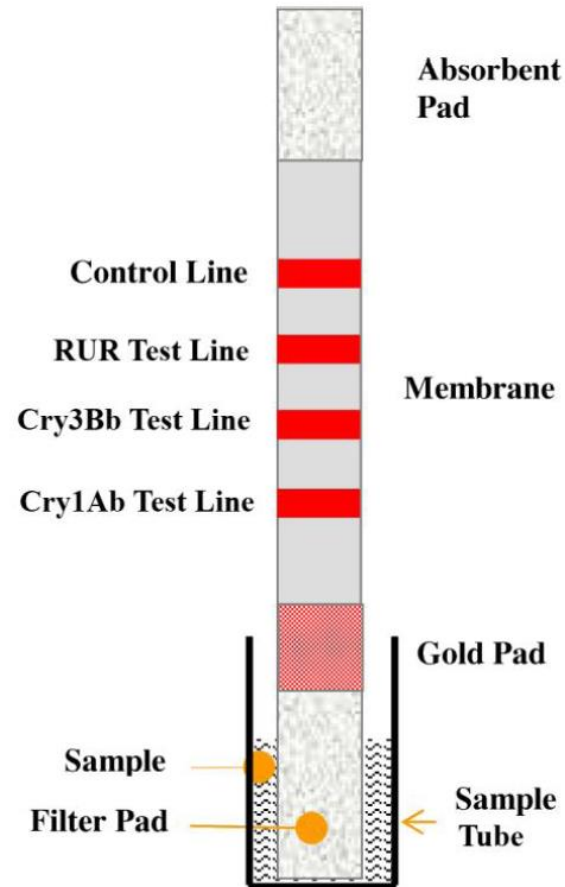
Lateral Flow Device



LFD



Multi meghatározás lehetősége



Example of test strip results (left to right)

- 1) Unreacted (left)
- 2) negative (non-GMO)
- 3) RUR positive
- 4) Cry3Bb positive
- 5) Cry1Ab positive
- 6) Cry3Bb and Cry1Ab positive
- 7) RUR, Cry3Bb and Cry1Ab positive

LFD – előnyök/hátrányok

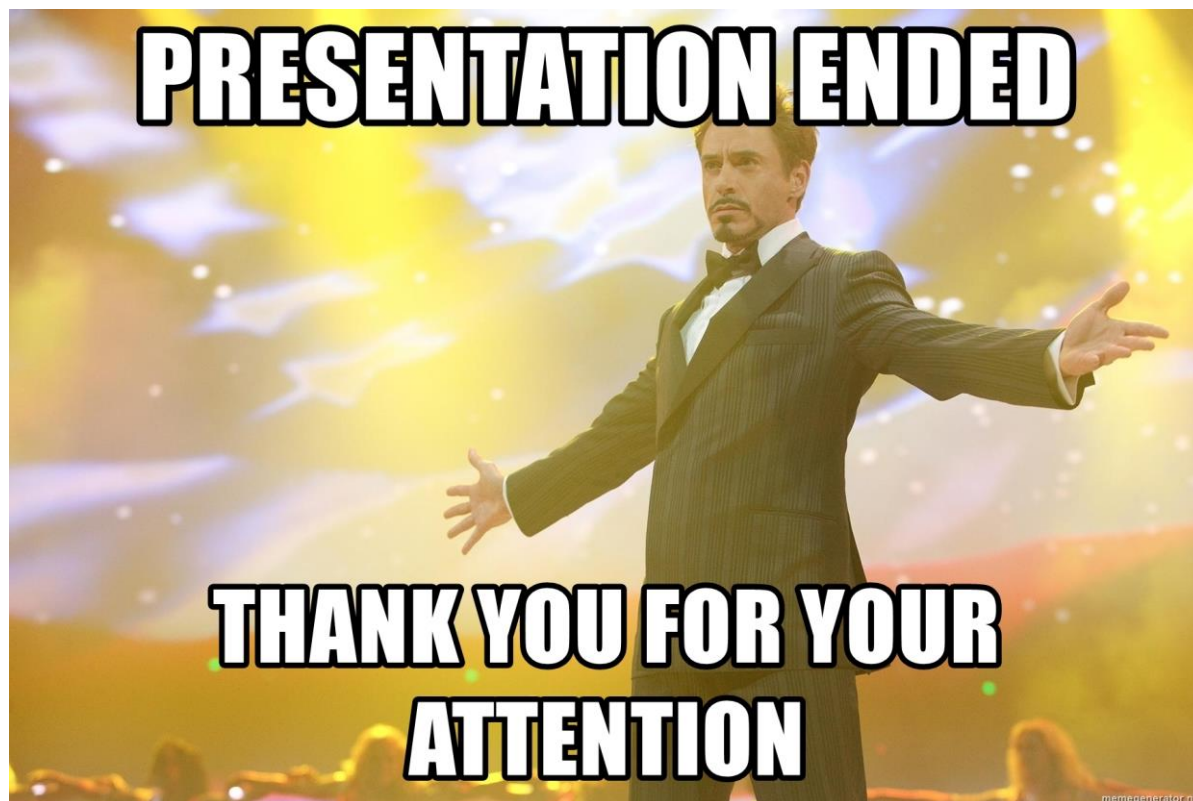


- Specifikus
- Egyszerű
- Gyors
- Laboron kívül is könnyen használható

- Csak minőségi meghatározás
- Esetleg szemikvantitatív meghatározás



Köszönöm a figyelmet!



Jövő héttől az előadások a biósokkal együtt a Ch A 10-ben